

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии  
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Е. И. Шишацкая

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

Оценка глутатионовой системы крови у больных  
раком прямой кишки до и после лечения

Научный руководитель \_\_\_\_\_ доцент, к.б.н. Н.М. Титова

Выпускник \_\_\_\_\_ В.А. Мишина

Красноярск 2019

## Содержание

Введение.....	3
1 Обзор литературы.....	5
1.1 Строение и функции эритроцитов.....	5
1.1.1 Метаболизм эритроцитов	6
1.1.2 Обезвреживание активных форм кислорода в эритроцитах	8
1.2 Глутатионовая антиоксидантная система.....	10
1.2.1 Глутатион.....	10
1.2.2 Глутатионпероксидаза.....	12
1.2.3 Глутатион– S – трансфераза.....	13
1.3 Рак прямой кишки.....	14
1.3.1 Основные классификации рака прямой кишки	14
1.3.2 Диагностика и лечение рака прямой кишки	16
2 Материалы и методы.....	18
2.1 Объект исследования.....	18
2.2 Определение содержания гемоглобина.....	18
2.3 Определение содержания восстановленного глутатиона.....	19
2.4 Определение активности глутатионпероксидазы.....	20
2.5 Определение активности глутатион-S-трансферазы.....	21
2.6 Статистическая обработка результатов.....	22
3 Результаты исследований и их обсуждение.....	23
3.1 Содержание восстановленного глутатиона и активность глутатион – зависимых ферментов в эритроцитах здоровых людей.....	23
3.2 Содержание восстановленного глутатиона и активность глутатион – зависимых ферментов в эритроцитах больных раком прямой кишки до лечения.....	24
3.3 Содержание восстановленного глутатиона и активность глутатион – зависимых ферментов в эритроцитах больных раком прямой кишки после лечения.....	27
Заключение.....	31
Список использованных источников.....	32

## Введение

Для обеспечения максимальной защиты от окислительного стресса клетки имеют хорошо развитую антиоксидантную систему, которая содержит разные низко- и высокомолекулярные соединения, способные «перехватывать» свободные радикалы и нейтрализовать источник их возникновения.

При действии разных экзогенных и эндогенных факторов, приводящих к развитию окислительного стресса, баланс между антиоксидантной системой и активными формами кислорода в клетках может нарушаться вследствие снижения уровня антиоксидантов или гиперпродукции активных форм кислорода. Такое состояние нарушенного окислительно-восстановительного статуса клеток, когда активные формы кислорода не могут быть нейтрализованы антиоксидантной системой, называется окислительным стрессом.

При окислительном стрессе происходят неконтролируемые процессы перекисного окисления липидов, нарушается структура и репликация ДНК, белки, в том числе и ферменты, теряют биологическую активность, что приводит к гибели клеток.

Усиление свободно – радикальных процессов и развитие состояния окислительного стресса являются одним из патогенетических звеньев воспалительных процессов любого генеза, гипоксических состояний, химических и радиационных поражений, также онкологических заболеваний.

Целью данной работы явилось изучение состояния глутатионовой антиоксидантной системы в эритроцитах больных раком прямой кишки до и после лечения.

Исходя из цели, сформулированы следующие задачи:

1. Определить содержание восстановленного глутатиона и активность глутатион-зависимых ферментов в эритроцитах здоровых людей.

2. Исследовать содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах больных раком прямой кишки до и после оперативного вмешательства.

3. Оценить активность глутатион – зависимых ферментов в эритроцитах больных раком прямой кишки до и после лечения.

Данная работа является частью комплексных исследований по изучению состояния антиоксидантной системы крови в норме и при патологии. Исследования проведены на базе кафедры медицинской биологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета.

## **1 Обзор литературы**

### **1.1 Строение и функции эритроцитов**

Эритроциты – высокоспециализированные клеточные элементы крови, которые переносят кислород от легких к тканям и диоксид углерода из тканей к альвеолам легких. Они являются самыми многочисленными форменными элементами крови. Однако количество форменных элементов крови изменчиво [1].

Мембрана эритроцита состоит двойного слоя амфифильных липидов, глубоко встроенных в мембрану интегральных белков и связанных лишь с одной из сторон мембраны периферических белков [2].

Плазматическая мембрана, обладает селективной проницаемостью для различных веществ, обеспечивает поддержание постоянства внутриклеточной среды, а также защищает клетку от воздействия неблагоприятных факторов внешней среды.

Наряду с липидами и белками в мембране присутствуют углеводы.

Основными функциями эритроцитов являются транспортная, защитная и гомеостатическая. Транспортная функция заключается способности переносить кислород и углекислый газ, питательные и биологически активные вещества. Защитная функция заключается в участии эритроцитов в процессах свертывания крови, способности связывать и обезвреживать различного рода токсины. На мембранах эритроцитов находятся специфические агенты, которые делают эритроциты участниками иммунологических реакций. Гомеостатическая функция обусловлена тем, что содержащийся в них гемоглобин может связывать углекислый газ, снижая тем самым концентрацию в крови угольной кислоты и стабилизируя pH [1].

В эритроцитах происходит синтез веществ, необходимых для жизнедеятельности клеток. Примером таких веществ является глутатион,

функция которого поддерживать ферментные системы в активном состоянии и обеспечивать окислительно-восстановительный статус в клетке [3].

Поскольку эритроциты лишены ядра и цитоплазматических органелл, они не способны к репарации, самовоспроизведению, синтезу белков, липидов, аэробному окислительному фосфорилированию. Другим следствием отсутствия ядра и органелл является возможность размещения дополнительного количества гемоглобина.

Отличительной особенностью строения эритроцитов является наличие эластичной клеточной мембраны, которая облегчает движение эритроцитов по узким капиллярам за счет присутствия в ней спектринов и гликофоринов; большая площадь поверхности, обеспечивающая эффективность газообмена, а также наличие специальной ферментативной системы, защищающей эритроциты от пагубного действия активных форм кислорода [4].

### **1.1.1 Метаболизм эритроцитов**

Эритроциты являются метаболически активными клетками крови и содержат более 40 различных ферментов. Главным источником энергии в зрелых эритроцитах является АТФ. Это вещество необходимо им для активного транспорта ионов через мембрану и образуется за счет анаэробного окисления глюкозы, что резко уменьшает потребности эритроцитов в кислороде.

Эффективность гликолиза характеризуется образованием двух молекул АТФ на одну молекулу глюкозы. Это небольшое количество энергии обеспечивает эритроциту выполнение всех его функций [4].

Отличительной особенностью метаболизма эритроцитов является наличие шунта Рапопорта-Люберинга и высокое для большинства видов млекопитающих содержание 2,3-бисфосфоглицерата, который значительно превышает внутриклеточный уровень АТР и регулирует кислородсвязывающую функцию гемоглобина [2].

В процессе метаболизма в эритроцитах происходит генерирование АТФ, образование и разрушение разных фосфатных эфиров, окисление и восстановление никотинамидных нуклеотидов.

В кровяное русло эритроциты выходят в виде ретикулоцитов, в которых содержится мРНК, тРНК, происходит интенсивный синтез гемоглобина, мембранных белков и ферментов. Именно в ретикулоцитах интенсивно протекает глицин-сукцинатный цикл, синтезируются пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, осуществляется синтез жирных кислот, триацилглицеролов, фосфолипидов, холестерина, протекают процессы переаминирования и дезаминирования аминокислот [5].

Характерной чертой метаболизма ретикулоцитов является наличие активного гликолиза, который не прекращается в присутствии кислорода. Субстратом окисления является глюкоза, поглощение которой в 4 раза превышает поглощение глюкозы эритроцитами. В присутствии метиленой сини более 80% глюкозы может окисляться через пентозный путь, в результате которого образуется восстановленная форма кофермента NADP, которая потом используется для восстановления глутатиона – основного компонента антиоксидантной системы эритроцита [6].

Помимо глюкозы, субстратами окисления в ретикулоцитах могут быть аминокислоты. Аминокислотный пул включает эндогенные аминокислоты, которые образуются при расщеплении митохондрий и рибосом и экзогенные – поступающие в клетку из плазмы крови [7]. Часть аминокислот подвергается окислению в цикле Кребса, оставшаяся часть используется для синтеза гемоглобина.

Переход ретикулоцитов в эритроциты сопровождается морфологическими и биохимическими изменениями. В процессе созревания ретикулоцита в эритроцит происходит снижение потребления кислорода, а содержание АТФ уменьшается в 2-3 раза.

Зрелые эритроциты утрачивают свою способность к биосинтезу гема, белков, жирных кислот, холестерина, фосфолипидов, пуриновых и пиримидиновых оснований.

Генетический дефект любого фермента гликолиза приводит к уменьшению образования нужного количества АТФ и  $\text{NADH} + \text{H}^+$  в этих клетках. Дефицит последних вызывает избыточное образование активных форм кислорода и накопление метгемоглобина, что способствует образованию дисульфидных мостиков между протомерами метгемоглобина и приводит к агрегации с образованием телец Хайнца (рис.1).

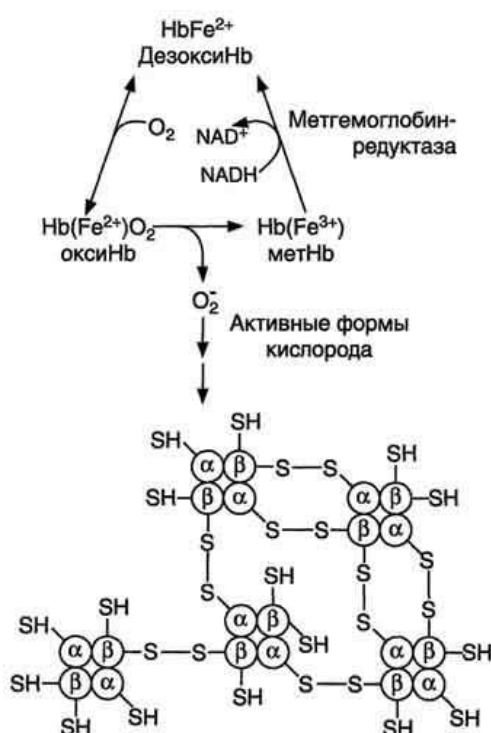


Рисунок 1 – Схема образования телец Хайнца – агрегация гемоглобина [8]

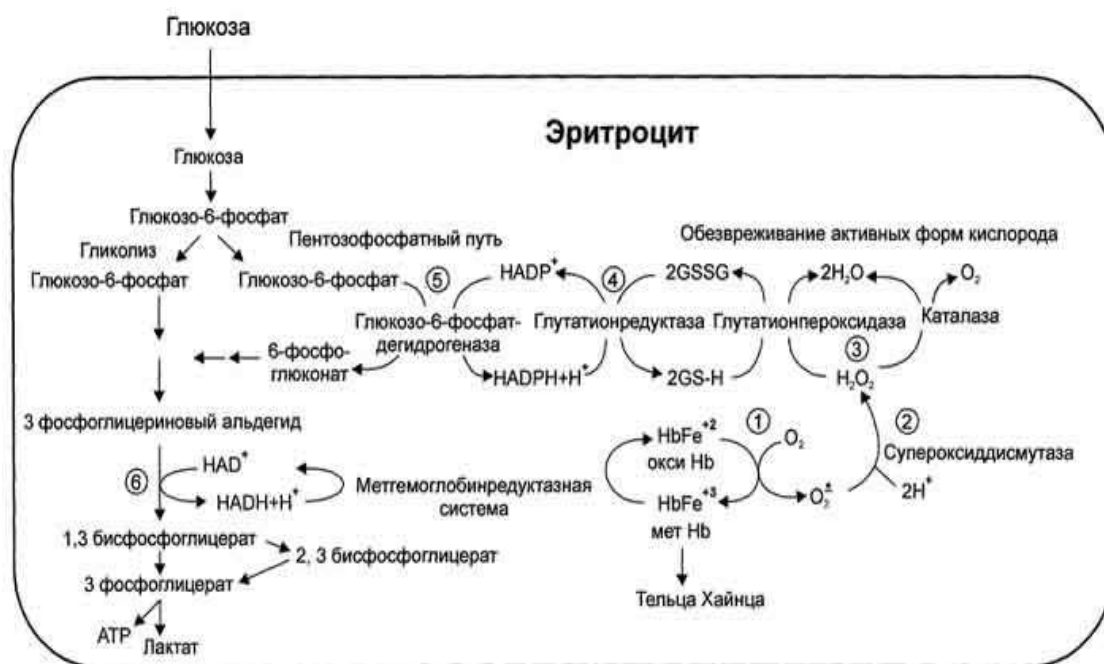
Избыточное накопление метгемоглобина в крови в результате нарушения транспорта кислорода приводит к гипоксии, а образовавшиеся тельца Хайнца способствуют разрушению и гемолизу эритроцитов.

### 1.1.2 Обезвреживание активных форм кислорода в эритроцитах



Большое содержание кислорода в эритроцитах определяет высокую скорость образования активных форм кислорода, например супероксидного анион-радикала ( $O_2^-$ ), пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и гидроксил радикала ( $OH$ ). Для того чтобы предотвратить токсическое действие выше перечисленных активных форм кислорода и разрушение мембран эритроцитов они имеют мощную ферментативную систему. Постоянным источником активных форм кислорода в эритроцитах служит неферментативное окисление гемоглобина в метгемоглобина [9].

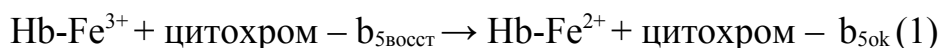
В течение суток до 3% гемоглобина может окисляться в метгемоглобин. Восстановление метгемоглобина в гемоглобин осуществляется метгемоглобинредуктазной системой, в состав которой входит цитохром –  $b_5$  и флавопротеинцитохром –  $b_5$  – редуктаза, донором водорода которой служит NADH, образующийся в глицеральдегиддегидрогеназной реакции гликолиза (рис.2) [7].



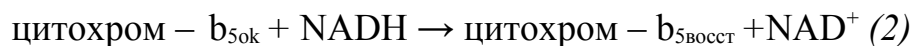
1–спонтанное окисление  $Fe^{2+}$  в геме гемоглобин–источник супероксидного аниона в эритроцитах; 2 – супероксиддисмутаза; 3 – каталаза; 4 – глутатионредуктаза; 5 – NADPH, необходимый для восстановления глутатиона; 6 – NADH, необходимый для восстановления гемоглобина метгемоглобинредуктазной системой

Рисунок 2 – Образование и обезвреживание активных форм кислорода в эритроците [7]

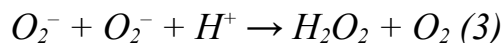
Цитохром –  $b_5$  восстанавливает  $Fe^{3+}$  в  $Fe^{2+}$  :



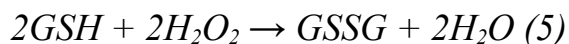
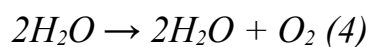
Окисленный цитохром – b<sub>5</sub> далее восстанавливается цитохром – b<sub>5</sub> – редуктазой:



Супероксидный анион с помощью фермента супероксиддисмутазы превращается в перекись водорода:



Пероксид водорода разрушается каталазой и содержащим селен – ферментом глутатионпероксидазой. Донором водорода в этой реакции служит восстановленный глутатион:



Окисленный глутатион восстанавливается NADH-зависимой глутатионредуктазой. Восстановление NADP для этой реакции обеспечивают окислительные реакции пентозофосфатного пути [6].

## 1.2 Глутатионовая антиоксидантная система

Глутатионовое звено антиоксидантной системы, включающее глутатион, глутатионпероксидазу, глутатион – S – трансферазу, глутатионредуктазу и NADPH участвует в транспорте аминокислот, обезвреживании свободных радикалов, перекисей, продуктов перекисного окисления липидов, белков, нуклеиновых кислот, фосфолипидов мембран и ксенобиотиков [10].

Глутатионовая антипероксидазная система эффективно защищает клетки от окислительного стресса, при ее недостаточности или истощении возникают нарушения работы клеток различных органов, повышается риск развития онкологических и ряда других заболеваний [11].

В организме человека существует 4 линии антиоксидантной ферментативной защиты, которые последовательно восстанавливают свободные радикалы, перекиси, продукты перекисного окисления липидов,

белков, ферментов. К первой линии защиты относят супероксиддисмутазу, которая участвует в восстановлении свободных радикалов с образованием перекисей. Вторая линия защиты представлена каталазой и глутатионпероксидазой. Функция данных ферментов заключается в восстановлении свободных радикалов до воды. В третьей линии защиты вместо каталазы появляется глутатионтрансфераза. Она катализирует реакцию глутатиона с различными радикалами, образуя нетоксичные конъюгаты. Глутатионпероксидаза выполняет уже другие функции, она участвует в восстановлении органических перекисей, образующихся при перекисном окислении липидов. В четвертой линии защиты присутствует только глутатионтрансфераза, которая выполняет те же функции, что и в предыдущей линии защиты [13].

Глутатионовая антиоксидантная система – это единственная система, которая участвует в 3 линиях защиты из 4 и вносит существенный вклад в функционирование антиоксидантной защиты организма.

Система глутатиона обеспечивает защитное действие при помощи 3 составляющих: антиоксидантной защиты (главным антиоксидантом которой является глутатион), детоксикации (выведении токсинов и химических веществ) и иммуностимуляции (стимуляции естественных киллеров и активации Т-лимфоцитов) [12].

### **1.2.1 Глутатион**

Глутатион ( $\gamma$  – глутамил – цистеин – глицин) – внутриклеточное тиолсодержащее соединение, синтезирующееся почти во всех эукариотических клетках. Данное соединение имеет большое значение для окислительно-восстановительных реакций. Благодаря своему строению и высокой внутриклеточной концентрации восстановленный глутатион выполняет антиоксидантные функции, играя роль «ловушки» свободных радикалов, косубстрата глутатионпероксидазы и глутатион – S – трансферазы

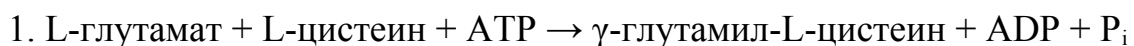
в реакциях детоксикации пероксидов [12]. Не менее важными функциями глутатиона являются его участие в качестве агента, восстанавливающего окисленный глутаредоксин, который необходим для восстановления дисульфидов, помимо этого он поддерживает клеточный редокс-статус, принимает участие в синтезе эйкозаноидов, регуляции многих механизмов клеточного сигналинга [13].

Глутатион может находиться как в восстановленной, так и в окисленной форме. На долю восстановленной формы приходится 90-95%, а количество окисленной формы не превышает 1% от общего внутриклеточного содержания восстановленного глутатиона. Такая высокая концентрация восстановленного глутатиона в клетке приводит к тому, что он способен восстанавливать любую дисульфидную связь, образующуюся между остатками цистеина внутриклеточных белков. Поддержание оптимального соотношения этих двух форм в клетке является существенным для ее нормального функционирования и выживания.

Примерно 85-90% восстановленной формы глутатиона находится в цитозоле, но некоторая часть после синтеза оказывается в митохондриях, ядре, пероксисомах, эндоплазматическом ретикулуме [11].

Ключевым функциональным элементом в молекуле глутатиона является остаток цистеина, обеспечивающий наличие реакционно способной тиольной группы.

Биосинтез восстановленной формы глутатиона осуществляется в цитозоле всех клеток млекопитающих. Исключением не являются и эритроциты. Из цитозоля он транспортируется через внутреннюю мембрану в матрикс митохондрий. Обратного транспорта нет. Процесс синтеза происходит в 2 стадии [14]:



Первая реакция катализируется  $\gamma$  – глутамилцистеинсинтетазой, вторая – глутатионсинтетазой. Регуляция глутамилцистеинсинтетазы

осуществляется 2 путями: конкурентным ингибированием глутатионом, которое является неаллостерическим и вовлекает восстановленный глутатион в связывание с глутаматным сайтом фермента и доступностью цистеина, избыток которого убиквитинируется и деградирует.

В иерархии различных видов транспорта восстановленной формы выделяют 3 вида транспорта: внутриклеточный, межклеточный и межорганный.

Характерная особенность внутриклеточного транспорта – зависимость от жидкостности мембран. Чем ниже жидкостность мембраны митохондрий, тем ниже концентрация восстановленного глутатиона [15].

Межклеточный транспорт лучше всего изучен в головном мозге. Астроциты, располагающие наиболее высокой концентрацией глутатиона из клеток головного мозга транспортируют в нейроны глутамин и цистеин-глицин, где последние расходуются на увеличенный синтез данного фермента.

Межорганный транспорт осуществляется 3 группами белков: белками лекарственной резистентности, полипептидами, транспортирующими органические анионы и белками, связывающими

Межорганный транспорт восстановленного глутатиона, его конъюгатов и окисленного глутатиона происходит во многих клетках. Он осуществляется 3 группами белков: белками множественной лекарственной резистентности, полипептидами, транспортирующими органические анионы и белками, связывающими ГТФ-связывающие белки. Все 3 группы белков транспортируют через клеточные мембраны в биологические жидкости, в том числе в эритроциты, восстановленный и окисленный глутатион, а также различные эндобиотики и ксенобиотики. Межорганный обмен глутатиона реализуется циклом печень-почка (рис.3).



Метаболитами данного пути являются: органический гидропероксид ( $\text{ROOH}$ ), гидроксильный метаболит ( $\text{ROH}$ ), рибонуклеотиддифосфат ( $\text{RNP}$ ), дезоксирибонуклеотиддифосфат ( $\text{dRNP}$ ), глутатионированный белок ( $\text{PrSSG}$ ), органический дисульфид ( $\text{RSSR}$ ), тиольный белок ( $\text{PrSH}$ ), глутатион или другой низкомолекулярный тиол ( $\text{RSH}$ ). Ферменты, участвующие в метаболизме восстановленного глутатиона:  $\text{NHN}$  – рибонуклеотидредуктаза,  $\text{GPO}$  – глутаредоксин,  $\text{GLB}$  – протеиндисульфидизомераза,  $\text{ФАДГ}$  – формальдегиддегидрогеназа,  $\text{ДП}$  – дипептидаза.

### 1.2.2 Глутатионпероксидаза

Глутатионпероксидаза ( $\text{EC } 1.11.1.9$ ,  $\text{GPO}$ ) – семейство селенсодержащих гомотетрамерных ферментов, в состав которых входит селеноцистеин, глутамин и триптофан. В настоящее время выявлено 6 изоферментных форм селенсодержащей глутатионпероксидазы. Изоформы кодируются разными генами, различаются по локализации в клетке, структуре субъединиц, первичной структуре и ферментативному действию [15]. Входящий в состав 6 изоформ селен участвует в поддержании структурной стабильности и функциональной активности как самой мембраны, так и комплекса мембраносвязанных ферментов, которые обеспечивают нормальную интенсивность обменных процессов [16].

Глутатионпероксидаза является важнейшим ферментом антиоксидантной системы, она утилизирует органические и неорганические пероксиды свободных жирных кислот, нуклеотидов, нуклеиновых кислот, белков, переводит пероксиды липидов в соответствующие спирты, используя в качестве субстрата восстановленный глутатион, а также защищает организм от оксидативного повреждения [14].

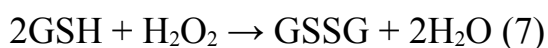
Наиболее высокая активность глутатионпероксидазы наблюдается в цитозоле (70%), митохондриях (20-30%), печени, эритроцитах и надпочечниках. Также значительное количество глутатионпероксидазы

содержится в нижних дыхательных путях, где она нейтрализует поступающие из внешней среды озон, окись азота и другие активные вещества [16].

Активность этого фермента в организме во многом определяет динамику патологических процессов и зависит содержания восстановленного глутатиона, активности глутатионредуктазы и уровня NADPH в клетке.

Помимо выше перечисленных функций, глутатионпероксидаза катализирует реакцию восстановления гидроперекиси с помощью глутатиона, обладает широкой субстратной специфичностью по отношению к гидроперекисям и абсолютной специфичностью к восстановленной форме глутатиона, который в ходе реакции переходит в окисленную форму [17]:

обладает широкой субстратной специфичностью по отношению к гидроперекисям и абсолютной специфичностью к восстановленному глутатиону, который в ходе реакций (6) и (7) переходит в окисленную форму [17]:



В описанных выше реакциях глутатион восстанавливает перекись водорода и органические радикалы до воды или гидроксипроизводных.

На данный момент изучено и описано 7 изоформ глутатионпероксидазы [16]:

1) Глутатионпероксидаза – 1 – «классическая» глутатионпероксидаза, которая находится в цитоплазме клеток печени и кишечника, эритроцитах и защищает клетки от индуцированного апоптоза в раковых клетках молочной железы и ингибирует 5–липоксигеназу в клетках крови, а гиперэкспрессия гена этой изоформы задерживает рост эндотелиальных клеток и повышает устойчивость к токсинам. Является Se-содержащим ферментом с молекулярной массой 22кДа, состоящим из 4 идентичных субъединиц, каждая из которых включает атом селена. Активность глутатионпероксидазы



– 1 наиболее высока в печени, надпочечниках, хрусталике, эритроцитах, поджелудочной железе [16].

2) Глутатионпероксидаза – 2 — изофермент кишечного эпителия, функцией которого является обезвреживание пероксидов липидов, поступающих с пищей в ЖКТ. По цитозольной локализации и идентичности аминокислотной последовательности ближе других к 1 изоформе. Важна для роста и дифференциации эпителиальных клеток. У человека локализована в печени и толстой кишке.

3) Глутатионпероксидаза – 3 – внеклеточный изофермент плазмы крови. Представляет собой гликопротеин с 40-50% гомологией с глутатионпероксидазой – 1. Данная изоформа преобладает в почках, особенно в эпителии проксимальных канальцев, обнаружена во многих органах, молоке, амниотической и альвеолярной жидкости. Имеет ограниченную специфичность к восстановленному глутатиону, участвует в восстановлении циркулирующих пероксидов [18].

4) Глутатионпероксидаза – 4 (фосфолипидгидропероксид – глутатионпероксидаза) – изофермент, содержащий 1 атом селена. Участвует в ингибировании перекисного окисления липидов. Являясь липофильным соединением, активно взаимодействует с гидроперекисями фосфатидилхолина, холестерина, и эфиров холестерина в мембранах и липопротеинах низкой плотности. Экспрессируется при участии альтернативного сплайсинга. Богата остатками гидрофобных аминокислот, поэтому легко взаимодействует с мембранами и наполовину находится в них. Существуют две формы данной изоформы: короткая, высоко экспрессируемая в ядрышке, ядре, ретикулуме и цитозоле, и длинная, обладающая сигнальным пептидом [16].

5) Глутатионпероксидаза – 5 – эпидермальный андроген связанный белок. Экспрессируется и секретируется как селен-независимый мономер. Участвует в защите мембран сперматозоидов от перекисного окисления липидов.

6) Глутатионпероксидаза – 6 – изофермент, функционирующий в зрительной системе. Ген локализован на 6 хромосоме.

Входя в состав перечисленных изоформ, селен участвует в поддержании структурной стабильности и функциональной активности как самой мембраны, так и комплекса мембраносвязанных ферментов, которые обеспечивают нормальную интенсивность обменных процессов.

Глутатионпероксидаза – 7 – не содержит атом селена. Экспрессируется во многих тканях, отсутствует в митохондриях. Активность этой изоформы обратно связана с пролиферацией клеток [18].

### **1.2.3 Глутатион – S – трансфераза**

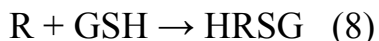
Значительная роль в клеточных редокс-зависимых процессах принадлежит глутатион – S – трансферазе (EC 2.5.1.18, GST), образующей суперсемейство изоформ катализирующих конъюгацию глутатиона с широким рядом неполярных соединений эндогенного и экзогенного происхождения. В суперсемействе глутатион – S – трансфераз выделяют 3 субсемейства изоформ: цитозольные, митохондриальные и микросомальные. Около 90% активности данного фермента в клетке приходится на долю цитозольных изоформ [18].

Глутатион–S–трансфераза представляет собой цитоплазматический белок, ответственный за конъюгацию сульфгидрильной  $\text{SH}_2$  – группы с электрофильными атомами углерода, азота, серы и кислорода молекул ксенобиотиков, с отщеплением восстановленного глутатиона, детоксикацию, пролиферацию и миграцию этих молекул [16].

К основным функциям выше названного фермента наряду с важной ролью в системе детоксикации относится участие в работе антиоксидантной системы благодаря способности восстанавливать органические гидроперекиси до спиртов, используя восстановленный глутатион в качестве косубстрата.

Большинство реакций осуществляемых глутатион – S – трансферазой можно разделить на 4 типа [11]:

1. Присоединение к субстрату (R) полной молекулы восстановленного глутатиона:



2. Нуклеофильное замещение:



3. Восстановление органических гидропероксидов и эндопероксидов до спиртов:



4. Изомеризация. Механизм реакции включает промежуточное присоединение восстановленного глутатиона, который используется как кофермент.

За счет селен – независимой глутатион-пероксидазной активности (глутатионпероксидазы-7) глутатион–S–трансфераза восстанавливает гидроперекиси полиненасыщенных высших жирных кислот, фосфолипидов и холестерина [19].

Существенной является роль в регуляции клеточного сигналинга за счет белок-белковых взаимодействий с киназами. Примером таких взаимодействий является восстановление пероксидазной активности глутатионпероксидазы [14].

### 1.3 Рак прямой кишки

Рак прямой кишки – это злокачественная опухоль, развивающаяся из эпителиальных клеток прямой кишки.

На сегодняшний день это одно из самых хорошо изученных заболеваний. Основная опасность данного заболевания состоит в том, что на поздних стадиях развития рак может вызывать кишечную непроходимость, т.е полностью перекрывать просвет кишки и препятствовать прохождению

пищи, а также может метастазировать в окружающих лимфатических узлах и других органах [20].

Согласно статистическим и эпидемиологическим исследованиям наблюдается интенсивный рост данного заболевания за последние 20-30 лет.

В структуре злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта рак прямой кишки занимает 5-е место по частоте заболеваемости и 4-е место по уровню смертности. Из 100 вновь выявленных больных с данным диагнозом на первом году умирает около 31% [21].

Существенным является тот факт, что, несмотря на возможности ранней диагностики в настоящее время довольно высок удельный вес осложненных клинических форм заболевания. К таким осложнениям относят кишечную непроходимость, перфорации опухоли и кишечной стенки, кровотечения, распространение опухоли на соседние органы и окружающие ткани [22].

На сегодняшний день к факторам риска рака прямой кишки относят: наличие аденом ободочной кишки, возраст старше 50 лет, употребление в пищу чрезмерного количества жиров и белков животного происхождения, рафинированных углеводов, наличие в анамнезе рака прямой кишки у родственников, ранее перенесенный рак молочной железы и/или женских половых органов, генетические синдромы, язвенный колит, болезнь Крона [21].

### **1.3.1 Основная классификация рака прямой кишки**

Существуют несколько классификаций рака прямой кишки, но наиболее распространенной является классификация по стадиям. Стадия заболевания окончательно устанавливается только после операции и тщательного морфологического исследования удалённого препарата. До операции стадия устанавливается только как предварительная, на основании данных МРТ.

Различают 4 стадии рака прямой кишки, каждую из которых делят еще на 2-3 подстадии. I и II стадии характеризуются отсутствием регионарных и отдалённых метастазов. Лечение на данных стадиях приносит успех у большинства больных. На III и IV стадиях образуются метастазы [23].

По типу роста опухоли различают 2 формы рака прямой кишки: экзофитный и эндофитный.

Экзофитные опухоли растут в просвет кишки в виде полипа, узла или ворсинчатого образования [24]. При распаде опухоли возникает так называемые блюдцеобразный рак, который имеет вид язвы с плотным дном и валикообразными краями, выступающими над поверхностью непораженной слизистой.

Эндофитный рак растет преимущественно в толще кишечной стенки. Опухоль распространяется по периметру кишки и охватывает ее циркулярно, вызывая сужение просвета. При распаде эндофитного рака образуется обширная язва, которая располагается по периметру кишки (язвенная или язвенно-инфильтративная форма) [25].

В настоящее время выделяют два пути метастазирования рака прямой кишки. Основным путем метастазирования является лимфогенный путь, частота метастазирования которого зависит от величины, расположения, формы роста и гистологического строения опухоли [26].

Гематогенный путь метастазирования обусловлен прорастанием опухоли в венозные сосуды. Гематогенные метастазы чаще всего встречаются в печени, реже в легких и надпочечниках.

Также различают имплантационные метастазы, они возникают при прорастании опухоли всех слоев стенки кишки и висцеральной брюшины. Опухолевые клетки отрываются от основной массы опухоли и распространяются по париетальной и висцеральной брюшине [27].

### **1.3.2 Диагностика и лечение рака прямой кишки**

От 20 до 50% больных при первичном обращении, а также при выполнении радикальных операций уже имеют отдаленные метастазы. Одной из наиболее часто встречающихся локализаций метастазов является печень, что обусловлено анатомо-физиологическими особенностями этого органа [28]. Лишь 10-15% отдаленных метастазов в печени резектабельны.

У больных раком прямой кишки на I и II стадиях 5-летняя выживаемость достигает до 93%, на III стадии этот показатель снижается до 25-60%. Пациенты с метастатическим раком прямой кишки на IV стадии не подлежат специальному лечению. Пятилетняя выживаемость у этой категории больных менее 10%, а по данным некоторых авторов, составляет всего 5-8% [29].

Диагностику рака прямой кишки подразделяют на лабораторную и инструментальную.

Лабораторная диагностика включает в себя развернутый клинический и биохимический анализы крови, анамнез, физикальный осмотр, исследование свёртывающей системы крови, оценку нутритивного статуса, а также анализы на онкомаркеры РЭА, СА 19.9 [30].

В качестве инструментальной диагностики проводят тотальную колоноскопию с биопсией, МРТ малого таза, рентгенологическое исследование толстой кишки (ирригоскопия) и ЭКГ [31]. В случаях резкого диссонанса в результатах рентгенологического и эндоскопического исследования используют компьютерную томографию органов брюшной полости и забрюшинного пространства с внутривенным контрастированием, а также ультразвуковое исследование, которое позволяет оценить местную распространенность опухолевого процесса и наличие отдаленных метастазов [32].

Наиболее информативным и достоверным методом диагностики является колоноскопия. Данный метод исследования позволяет обнаружить начальные формы опухолевого процесса, визуализировать опухоль, определить ее размеры, локализацию и макроскопический тип, получить

материал для морфологического исследования, а также оценить угрозу осложнений [33].

Магнитно – резонансная томография малого таза позволяет определить локализацию, протяженность и глубину инвазии опухоли, оценить состояние регионарных лимфатических узлов [34].

Основным методом лечения рака прямой кишки является хирургическое лечение. Оно позволяет выполнить полное удаление опухоли в пределах здоровых тканей. Для подавления последующего опухолевого роста используются лучевая иммуномодулирующая и химиотерапия [35].

## **Материалы и методы**

### **2.1 Объект исследования**

В качестве объекта исследования служили эритроциты здоровых людей (группа контроля) – 70 человек и людей больных раком прямой кишки до и после лечения (50 пациентов). Кровь у больных забиралась в день поступления в стационар и на 7 сутки после операции. Средний возраст больных раком –  $61,7 \pm 1,1$  лет. Каждый пациент подписал согласие на участие в исследовании, которое было одобрено Локальными этическими комитетами ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАН и КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского».

Кровь забиралась из локтевой вены обследуемых в вакутейнеры с гепарином, в качестве антикоагулянта. Гепаринизированную кровь центрифугировали при 4°C 15 минут при 1700 g. После центрифугирования отбирали и удаляли плазму.

Для приготовления упакованных эритроцитов клеточную массу, оставшуюся после отбора плазмы, трижды отмывали физиологическим раствором и центрифугировали при 1700 g. Полученные супернатанты

отбрасывали, клетки крови хранили в виде аликвот при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до использования [36].

## 2.2 Определение содержания гемоглобина

Гемоглобин крови, взаимодействуя с железосинеродистым калием, окисляется в метгемоглобин. Метгемоглобин в свою очередь образует с ацетонциангидрином гемиглобинцианид (цианметгемоглобин), оптическая плотность которого при 540 нм пропорциональна концентрации Hb в образце крови [36].

Ход работы:

К 5 мл трансформирующего раствора добавляли 0,02 мл гемолизата, приготовленного в соотношении 1:2 (эритроциты: дистиллированная вода, охлаждённая до  $0^{\circ}\text{C}$ ), тщательно перемешивали. Через 10 мин проводили измерение оптической плотности в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 540 нм против трансформирующего раствора. Содержание гемоглобина (г/л) рассчитывали по формуле:

$$Hb(\text{г/л}) = D_{540} * 367,7$$

Реактивы:

1. Трансформирующий реагент (натрий углекислый кислый, 1,0 г; калий железосинеродистый, 200 мг);
2. Калибровочный раствор гемоглобина с концентрацией 120 г/л;

## 2.3 Определение содержания восстановленного глутатиона

Содержание восстановленного глутатиона определяли по взаимодействию восстановленного глутатиона с ДТНБК. В результате реакции образовывались окрашенные в желтый цвет анионы 2-нитро-5-тиобензоата. Увеличение концентрации желтого аниона в ходе данной реакции регистрировали спектрофотометрически при длине волны 412 нм.



#### Ход работы:

Гемолизат готовят добавлением 0,1 мл эритроцитов к 0,9 мл дистиллированной воды, охлажденной до 0 °С. Для осаждения белков к гемолизату добавляют 1,5 мл осаждающего раствора. Пробы тщательно перемешивают и после 20-минутного стояния при комнатной температуре фильтруют через крупнопористый фильтр. В спектрофотометрическую кювету с толщиной слоя 1 см помещают 0,5 мл фильтрата, добавляют 2,0 мл фосфатного буфера. Поскольку раствор ДТНБК имеет слабожелтую окраску, параллельно с опытной пробой готовят контрольную, содержащую вместо фильтрата осаждающий раствор, разведенный дистиллированной водой в отношении 2:5. Пробы фотометрируют до и после добавления ДТНБК. Затем в контрольную и опытную пробки вносят по 0,25 мл раствора ДТНБК. Сразу же после перемешивания должна появиться желтая окраска из-за образования дисульфида глутатиона с ДТНБК. Пробы фотометрируют в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см против воздуха [36]. Содержание восстановленного глутатиона рассчитывают по формуле и выражают в мкмоль/г Нб:

$$C = \frac{(E_2 - E_1) * f}{\epsilon * Hb}, \text{ где}$$

C – содержание восстановленного глутатиона;

$E_1$  – оптическая плотность опытной пробы до добавления ДТНБК;

$E_2$  – оптическая плотность опытной пробы после добавления ДТНБК;

f – коэффициент разведения;

$\epsilon$  - коэффициент молярной экстинкции

#### Реактивы:

1. Осаждающий раствор (1,67 г ледяной ортофосфорной кислоты, 0,2 г ЭДТА и 30 г хлористого натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки 100 мл).

2. Фосфатный буфер (0,3 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

3. 1 % раствор цитрата натрия.

4. 0,02% раствор дитионитро(бис)бензойной кислоты, приготовленный на 1 % растворе цитрата натрия.

## 2.4 Определение активности глутатионпероксидазы

Активность фермента оценивали по изменению содержания восстановленного глутатиона в пробах до и после инкубации с модельным субстратом в ходе цветной реакции с ДТНБК [36].

Реактивы:

1. 0,1М трис-НС1 буфер с 0,01% содержанием ЭДТА, pH=8,5;
2. Сложный буфер;
3. 0,14% раствор ГПТБ;
4. 20% раствор ТХУ;
5. Абсолютный метанол;
6. 0,4 % раствор ДТНБК, разведенный на абсолютном метаноле;

Ход работы:

Отмытые и упакованные эритроциты гемолизуют охлажденной до 0°C водой в соотношении 1:200. 0,2 мл гемолизата смешивают с 0,73 мл сложного буфера и термостатируют 10 минут при 37°C. Реакцию инициируют внесением в реакционную смесь 0,07 мл раствора ГПТБ. Через 5 минут инкубации при 37°C реакцию останавливают добавлением 0,2 мл раствора ТХУ. В контрольные пробы раствор ГПТБ вносят после осаждения белка ТХУ. Полученные пробы центрифугируют при 1700 g в течении 10 минут. Полученный супернатант используют для определения количества восстановленного глутатиона. Для этого к 0,1 мл супернатанта добавляют 2,65 мл 0,1М трис-НС1 буфера и 0,025 мл раствора ДТНБК. После перемешивания пробы фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см против

дистиллированной воды (опытную пробу против контрольной оставляют холостой) [36]. Активность фермента рассчитывают по формуле и выражают в мкмоль/мин\*г Нб:

$$A = \frac{(E_k - E_o) * f * 1000}{\epsilon * d * Hb}, \text{ где}$$

$E_o$  – оптическая плотность опытной пробы;

$E_k$  – оптическая плотность контрольной пробы;

$f$  – коэффициент разведения;

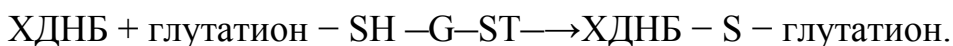
$d$  – толщина слоя кюветы;

$\epsilon$  – коэффициент молярной экстинкции;

1000 – коэффициент пересчета ммоль в мкмоль.

## 2.5 Определение активности глутатион – S – трансферазы

Активность глутатион – S – трансферазы оценивали по скорости образования глутатион – S – конъюгатов между восстановленным глутатионом и 1-хлор-2,4-динитробензолом:



Увеличение концентрации конъюгатов в ходе реакции регистрировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Ход работы:

В кювету с длиной оптического пути 1 см помещают 2,5 мл калий-фосфатного буфера, добавляют 0,2 мл раствора восстановленного глутатиона и 0,1 мл эритроцитов. Реакцию инициируют внесением в стеклянную кювету 0,2 мл раствора ХДНБ. Сразу же после этого пробу перемешивают и зануляют прибор. Регистрацию оптической плотности проводят в течение 2 минут при температуре 25°C. Активность фермента рассчитывают по формуле и выражают в мкмоль/мин\*г Нб [36] :

$$A = \frac{\Delta E * f}{\epsilon * d * t * N_b}, \text{ где}$$

$\Delta E$  – изменение оптической плотности в минуту;

$d$  – толщина слоя кюветы;

$\epsilon$  – коэффициент молярной экстинкции;

$f$  – коэффициент разведения;

Реактивы:

1. 0,1М калий-фосфатный буфер, рН=6,5;
2. 0,015М раствор восстановленного глутатиона;
3. Абсолютный метанол;
4. 0,015М раствор ХДНБ;

## 2.6 Статистическая обработка результатов

По результатам проведенных исследований была сформирована база данных, которую использовали для проведения статистического анализа с помощью пакета прикладных программ Statistica 13 и Microsoft Office Excel 2016. Рассчитывали медиану и интерквартильный разброс (С25-С75 процентиля). Достоверность различий между обследованными группами оценивали по критерию Манна-Уитни (при  $p < 0,05$ ).

### **3 Результаты исследований и их обсуждение**

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

### Список использованных источников

1. Чеснокова, Н.П. Метаболические особенности эритроцитов / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Успехи современного естествознания, 2015. – Т.2. – С. 331–332.
2. Бышевский, А. Ш. Биохимия для врача : учебник / А. Ш. Бышевский, О. А. Терсенов. – Екатеринбург : Уральский рабочий, 1994. – 384 с.
3. Kuhn, V. Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia / V. Kuhn, L. Diederich, S. Keller [et al] // Antioxidants and redox signaling, 2017. – Т.26, № 13. – P. 718-742.
4. Белевич, Е.И. Эритроциты – запрограммированная гибель эритроцитов / Е. И. Белевич, Д. Г. Костин, Е. И. Слободянина // Успехи современной биологии, 2014. – Т.134, № 2. – С. 149–157.
5. Hattangadi, S. M. Regulation of erythrocyte lifespan: do reactive oxygen species set the clock? / S. M. Hattangadi, H. F. Lodish // The Journal of Clinical Investigation, 2017. – Т.117, №8. – P. 2075-2077.
6. Липунова, Е.А. Физиология крови : монография / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина. – Белгород : БелГУ, 2014. – 44-45 с.
7. Ленинджер, А. Основы биохимии : учебник / А. Ленинджер. – Москва: Мир, 1985. – 156 с.
8. Лелевич, В. В. Биологическая химия : учебное пособие для студентов / В. В. Лелевич. – Гродно, 2009. – 154 с.
9. Пустовалова, Л.М. Практикум по биохимии / Л.М. Пустовалова. – Ростов-на Дону : Феникс, 1999. – 540 с.
10. Тапбергенов, С.О. Глутатионовая редокс-система и ферменты антиоксидантной защиты при гипотиреозе и адреналэктомии / С.О. Тапбергенов, Б.С. Советов, Р.Б. Бекбосынова // Успехи современного естествознания, 2015.– Т.2. – С. 192-194.
11. Кулинский, В.И. Система глутатиона: синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биомедицинская химия, 2015. – Т.55, №3. – С. 255-277.

12. Cheng, Shao-Bin. Changes of Oxidative Stress, Glutathione, and Its Dependent Antioxidant Enzyme Activities in Patients with Hepatocellular Carcinoma before and after Tumor Resection / Hsiao-Tien Liu, Sin-Yuan Chen, Ping-Ting Lin [et al] // *Journal Biochimica et Biophysica Acta*. – Taiwan, 2017. – V.12, I.1. – P. 1213-1220.
13. Толпыгина, О.А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты / О.А. Толпыгина // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*, 2012. – Т.2, №2. – С. 5-9.
14. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes / M. Deponte // *Journal Biochimica et Biophysica Acta*, 2013. – V.1830, I. 5. – P. 3217–3266.
15. Калинина, Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е.В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова // *Успехи биологической химии*. – Москва, 2014. – Т.54. – С. 300-306.
16. Матейкович, П.А. Глутатионпероксидаза как фермент системы антиоксидантной защиты клеток / П.А. Матейкович // *International Scientific Journal*, 2016. – Т.3, №6. – С. 3–28.
17. Гаврилюк, Л.А. Состояние системы глутатионредуктаза – глутатионпероксидаза в крови больных острым лимфобластным лейкозом / Л.А. Гаврилюк, М.В. Робу, С.И. Терещенко // *Экспериментальные и теоретические исследования в современной науке*, 2017. – Т.3, № 8. – С.15-20.
18. Shiping, H. Glutathione-S-transferase enhances proliferation-migration and protects against shikonin-induced cell death in breast cancer cells / H. Shiping // *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 2011. –V. 27, I.11. – P. 479-480.
19. Коляскина, М.М. Глутатион–S–трансфераза в патогенезе профессиональных заболеваний кожи / М.М. Коляскина // *Здравоохранение Российской Федерации*, 2013. – Т.3, №5. – С. 46.
20. Полянская, Е.А. Скрининг рака толстой кишки: достижения и перспективы / Е.А. Полянская, М.Ю. Федянин, А.А. Трякин, С.А. Тюляндин // *Онкологическая колопроктология*, 2018. – Т.8, №8. – С. 11-29.
21. Бурцев, Д.В. Структура злокачественных заболеваний толстой кишки и диагностические мероприятия по их выявлению на базе регионального

- консультативно-диагностического центра / Д.В. Бурцев // Фундаментальные исследования. – Москва, 2012. – Т.4, №1. – С. 34-37.
22. Алиев, С.А. Современные тенденции и перспективы в хирургическом лечении опухолевой непроходимости ободочной кишки у больных старших возрастных групп / С.А. Алиев // Российский онкологический журнал, 2015. —Т.5, № 4.—С. 21–29.
23. Яицкий, Н.А. Особенности хирургического лечения больных запущенными формами рака ободочной и прямой кишок / Н.А. Яицкий, С.В. Васильев, М.В. Оношко // Проблемы колопроктологии, 2016. — Т.7, №16. — С. 242–249.
24. Алиев, Ф.Ш. Эпидемиология рака прямой кишки: мировые и региональные тенденции / Ф.Ш. Алиев, Е.Н. Десятов, А.Г. Крутских [и др.] // Медицинская наука, 2015. – Т.17, №4. – С. 125-128.
25. Шаназаров, Н.А. Эпидемиологические аспекты рака прямой кишки на современном этапе / Н.А. Шаназаров, А.М. Машкин, К.У. Батырбеков // Современные проблемы науки и образования, 2014. – №3. – С. 499-504.
26. Зитта, Д.В. Клинико-биохимическая оценка эффективности программы оптимизации периоперационного ведения больных в плановой колоректальной хирургии / Д.В. Зитта, Н.А. Терёхина, В.М. Субботин // Колопроктология, 2015. – Т.22, №2. – С. 18-24.
27. Опенко, Т.Г. Колоректальный рак: тенденции за четверть века в Новосибирске, возможности раннего выявления и профилактика / Т.Г. Опенко, О.В. Решетников, С.А. Курилович [и др.] // Вопросы онкологии, 2014. – Т.60, № 6. – С. 687-694.
28. Огнерубов, Н.А. Рак прямой кишки в тамбовской области: некоторые аспекты эпидемиологии / Н.А. Огнерубов, А.А. Иванников, В.В. Милованов, В.Л. Чанг // Вестник ТГУ, 2015. – Т.20, №6. – С. 1679-1683.
29. Чернядьев, А.С. Осложненный рак прямой кишки: анализ современного состояния проблемы /А.С. Чернядьев, А.А. Засорин, К.И. Максимова // Российский онкологический журнал, 2016. –Т.4, №7.—С.156-160.




30. Ахметзянов, Ф.Ш. Осложненный непроходимостью рак прямой кишки: кишечная стома или первичный анастомоз? / Ф.Ш. Ахметзянов, В.И. Егоров // Вопросы онкологии, 2017. – Т.63, № 1. – С. 7-13.
31. Власов, О.А. Рак прямой кишки и особенности его метастазирования / О.А. Власов, С.И. Ткачев, В.В. Пророков // Вопросы онкологии, 2017. – Т.63, № 3. – С. 450-455.
32. Аюпов, Р.Т. Местнораспространенный рак прямой кишки / Р.Т. Аюпов, А.Ю. Парфенов // Хирургия и онкология, 2016. – Т.12, №4. – С. 36-43.
33. Кит, О.И. Воспаление и рак толстой кишки. Молекулярно-иммунологические механизмы / О.И. Кит, Е.А. Никипелова, А.В. Шапошников // Вопросы онкологии, 2018. – Т.64, № 1. – С. 34-40.
34. Стегний К.В. Опыт лечения пациентов с колоректальными опухолями / К.В. Стегний, Р.А. Гончарук, Е.Р. Двойникова, А.А. Кречотень // Тихоокеанский медицинский журнал, 2018. – №1. – С. 38-40.
35. Гарманова, Т.Н. Роль воспаления в течении и лечении рака прямой кишки / Т.Н. Гарманова, М.И. Бредихин, И.А. Тулина, П.В. Царьков // Исследования и практика в медицине, 2018. – Т.5, №4. – С. 36-45.
36. Титова, Н.М. Оценка структурно-функционального состояния клетки/ Н.М. Титова, Т.Н. Замай, Т.Н. Субботина, А.А. Савченко. – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – 18-19 с.
37. Зуйков, С.А. Исследование соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем при опухолях кишечника / С.А. Зуйков, Б.Г. Борзенко, О.В. Зуйкова // Сибирский онкологический журнал, 2014. – Т.4, №2. – С. 24-27.
38. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю. А. Владимиров // Сорровский образовательный журнал, 2000. – Т. 6, № 12. – С. 13-19.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии  
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

Е. И. Шишацкая

« 6 » 06 2019 г.

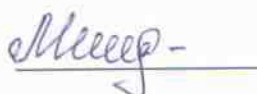
**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 - Биология

Оценка глутатионовой системы крови у больных  
раком прямой кишки до и после лечения

Научный руководитель  доцент, к.б.н. Н.М. Титова

Выпускник



В.А. Мишина

Красноярск 2019